

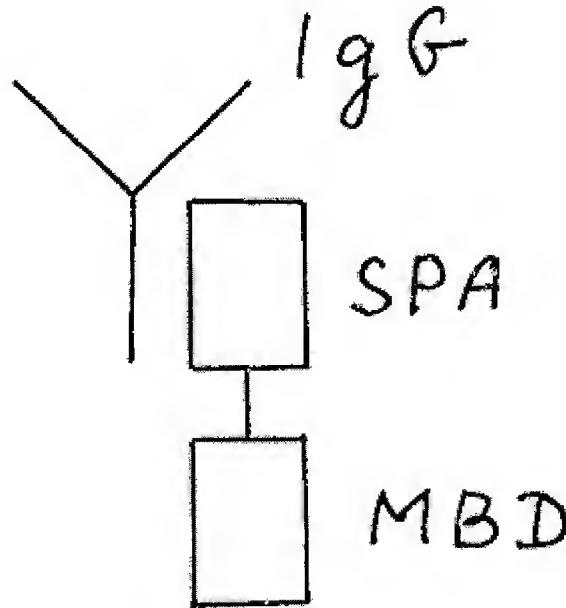
New fusion protein, useful for treating leukemia and solid tumors, comprises specific antigen-binding, microtubulin-binding and immune response-inducing regions, also related nucleic acid

Publication number: DE10350131
Publication date: 2005-06-16
Inventor: CHERKASKY ALEXANDER (DE)
Applicant: CHERKASKY ALEXANDER (DE)
Classification:
- **international:** C07K19/00; C07K19/00; (IPC1-7): C07K19/00
- **european:**
Application number: DE20031050131 20031028
Priority number(s): DE20031050131 20031028

[Report a data error here](#)

Abstract of DE10350131

Fusion protein (FP) that contains specific antigen-binding regions (AbR); microtubulin-binding regions (MbR) and immune response-inducing regions (IRIR) is new. - Fusion protein (FP) that contains specific antigen-binding regions (AbR); microtubulin-binding regions (MbR) and immune response-inducing regions (IRIR) is new. Preferred AbR are EGF, FGF, CSF, MGF, IL-15 or -2, or other ligands or their regions; MbR are preferably gephyrin, tau, MAP, MID-1, MBP, put MBP, PMBP, FLJ31424fis, or their regions; and IRIR are preferably the Fc part of immunoglobulin G (IgG), B7.1 or B7.2, or their regions. - Independent claims are also included for: - (1) fusion protein (FP1) that contains antibody-binding regions, preferably staphylococcal protein A (SPA); extracellular regions of the Fc receptor CD64, or their regions, and MbR as above; and - (2) nucleic acid and amino acid sequences; DNA (including vectors), and expression systems for FP and FP1. - ACTIVITY - Cytostatic. - No biological data given. - MECHANISM OF ACTION - Binding to microtubuli or cytoskeleton in tumor cells, so interfering with cell division and inducing cell death; also stimulation of an immune response.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 103 50 131 A1 2005.06.16**

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 103 50 131.2

(51) Int Cl.⁷: **C07K 19/00**

(22) Anmeldetag: 28.10.2003

(43) Offenlegungstag: 16.06.2005

(71) Anmelder:

Cherkasky, Alexander, 40477 Düsseldorf, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

DE 101 62 870 A1

DE 101 61 899 A1

DE 101 61 738 A1

(72) Erfinder:
gleich Anmelder

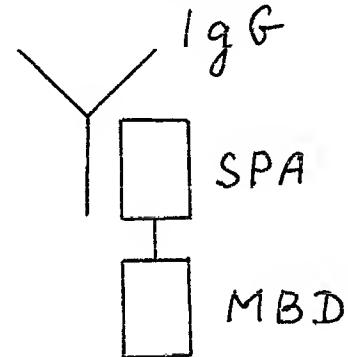
Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen
Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Fusionsproteine enthaltend Antikörperbinde- und Mikrotubuli-Binderegionen**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Bereiche
der Tumorphysiologie und der Biotechnologie.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, penetrierende
Antikörper, vorzugsweise IgG so zu modifizieren, dass sie
das Zellwachstum hemmen und somit Tumor und Protozoen-
zellen schädigen können.

Die Aufgabe der Erfindung wird Fusionsproteine enthaltend
Antikörper-Binde- und Mikrotubuli-Binderegionen gelöst.



Beschreibung

Stand der Technik

[0001] Die Erfindung betrifft die Bereiche der Tumorphysiologie und der Biotechnologie.

[0002] In der Tumorthерапie stellen Operationen, Bestrahlung und Chemotherapie nach wie vor die entscheidenden Maßnahmen zur Therapie der Erkrankung dar. Bei der chemischen Tumorthерапie (Chemotherapie) werden je nach Tumortyp meist Zytostatika unterschiedlicher Wirkungsart verwendet, so etwa Alkylantien, Nitrosoharnstoffverbindungen, Folsäureantagonisten, Pyrimidin- und Purinanaloga wie Fluorouracil, Antibiotika mit Wirkung auf die DNA-abhängige RNA-Polymerase oder Enzyme wie L-Asparaginase. Eine Gruppe von Cytostatika für die Chemotherapie sind die Mitosehemmstoffe wie etwa Taxol und Vinca-Alkaloide.

[0003] Auf Grund ihrer sehr guten Antitumor-Aktivität haben besonders die Mitosehemmstoffe in letzter Zeit verstärkte Beachtung gefunden. Die Mitosehemmer beeinflussen den Aufbau oder Abbau der aus Mikrotubuli bestehenden Teilungsspindel – und greifen somit an der Zellteilung an. Das bekannte Colchicin- oder Vinca-Alkaloide binden an spezifischen Bindestellen des α - oder β -Tubulins – als Baustein der Mikrotubuli – und bewirken z.B. eine Hemmung des Aufbaus der Mikrotubuli. Andere Mitosegifte – beispielsweise das Taxol – bewirkt deren Destabilisierung.

[0004] Mitose- oder Spindelgifte sind hochgradig toxisch und sind daher für therapeutisches Zwecke problematisch. Die Toxizität von Colchicin ist sogar so hoch, daß diese Substanz bislang gar nicht therapeutisch verwendet wird. Das aus Eiben (Taxus) isolierte Alkaloid Taxol ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung.

[0005] Die meisten Mitosehemmer binden an das β -Tubulin der Mikrotubuli. Dazu weisen sie Bindungsstellen auf, deren unterschiedliche hohe Spezifität für eine Klassifizierung der Mitosehemmer herangezogen wird. So werden verschiedene Gruppen wie der Colchizin-Typ, der Taxan-Typ, der Vinca Alkaloid Typ oder der Rhyoxin Typ unterschieden.

[0006] Auf Grund der hohen Toxizität der Zytostatika ist eine Therapie mit diesen Substanzen mit vielen Nebenwirkungen verbunden, die für die betroffenen Patienten oft kaum erträglich sind. Daher wird seit vielen Jahren an der Verbesserung der Therapien mit der Zielsetzung der Vermeidung oder Reduzierung der Nebenwirkungen gearbeitet. Ein Ansatz dazu stellt der Versuch dar, die Wirkstoffe gezielt nur zu den zu therapiierenden Zellen – d. h. zu den Zielzellen – zu lenken.

[0007] Eine Möglichkeit zur Verwirklichung dieses Ansatzes basiert im wesentlichen darauf, zelltyp-spezifische Epitope zu identifizieren, einen Epitop-spezifischen monoklonalen Antikörper zu erzeugen und den derart gewonnenen Antikörper oder Antigen-bindende Fragmente davon mit einem therapeutisch wirksamen Molekül zu koppeln. Ein derartiger Ansatz ist Gegenstand eines Forschungsprojekts der Universität von Kalifornien mit dem Ziel einer spezifischen Therapie von Brustkrebs (Sherie L. Morrison, Ph.D.: "Antibody Fusion Proteins for the Therapy of Breast Cancer", University of California, Los Angeles, 1997–1999). Hierbei wurden Antikörper gegen die brustkrebspezifischen Moleküle her2/neu und CEA verwendet und mit immunstimulierenden Molekülen verbunden, welche die Aktivität der T-Zellen stimulieren.

[0008] Obwohl dieser Ansatz mit dem Vorteil einer hohen therapeutischen Selektivität einhergeht, ist er in der Praxis nur unter großen Anstrengungen bei hohem Aufwand und langer Entwicklungsdauer umzusetzen, da zahlreiche Entwicklungsschritte zu seiner Realisierung erforderlich sind. Hierzu müssen zunächst für den jeweiligen Zelltyp spezifische Antigene isoliert werden. Da es sich bei diesen in der Regel um Proteinantigene handelt, werden im folgenden zellspezifische Epitope des Antigens ermittelt, die möglichst geringe Ähnlichkeiten zu Epitopen der Proteine anderer Zelltypen aufweisen. Dies ist erforderlich zur Vermeidung von Kreuzreaktivitäten der therapeutisch eingesetzten Antikörper. Anschließend erfolgt die Herstellung monoklonaler, gegen das jeweilige Antigen gerichteter Antikörper, die im weiteren aufwendigen Selektions- und/oder Mutageneseverfahren wie etwa Phage Display unterzogen werden müssen, um zu einem Antikörper möglichst hoher Spezifität, bzw. möglichst geringer Kreuzreaktivität zu gelangen.

[0009] Darüber hinaus ergeben sich häufig Schwierigkeiten bei der Herstellung des gebrauchsfertigen Therapeutikums, da ein nicht-humaner Antikörper modifiziert werden muß, um ohne hohes allergenes Potential eingesetzt werden zu können. Dazu können die variablen Regionen, insbesondere jedoch die Complementary determining regions (CDR) in ein humanes Antikörpergerüst eingesetzt, wobei im fertigen Therapeutikum unterschiedlich große antigenspezifische Elemente des therapeutischen Antikörpers, so etwa die antigenbindenden Fragmente (Fab) zum Einsatz kommen. Dabei handelt es sich in aller Regel um antigenspezifische Elemente, die mindestens aus zwei separaten Polypeptidketten bestehen. Die Herstellung dieser komplexen antigenspezifischen Elemente und ihre Verknüpfung mit dem eigentlich therapeutischen Molekül ist in der Praxis oft aufwendig und erfordert komplexe Expressionskonstrukte und

entsprechend geeignete Wirtszellen. Nachteile bestehen darin, dass penetrierende Antikörper entweder gar nicht oder mit radiaktiven Isotopen oder mit Cholera-Toxinen modifiziert sind.

Aufgabenstellung

[0010] Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, penetrierende Antikörper, vorzugsweise IgG so zu modifizieren, dass sie das Zellwachstum hemmen und somit Tumor und Protozoenzellen schädigen können.

[0011] Die Aufgabe der Erfindung wird Fusionsproteine enthaltend Antikörper-Binde- und Mikrotubuli-Binderegionen gelöst.

[0012] Die Wirkung dieser Fusionsproteine-Antikörper-Komplexen besteht darin, Mikrotubuli- bzw. Zytoskelett zu finden bzw. zu fesseln nachdem die Tumorzellen durch hochaffine Antikörper ihre Zielzellen binden und penetrieren.

[0013] Die Antikörper Binderegion ist z.B. Staphylokokken protein A (SPA), extrazelluläre Region des Fc Rezeptors CD 64 etc.

[0014] Die Mikrotubuli-Binderegion ist z.B. Gephyrin, MID-1, MAP, Tau etc.

[0015] Diese Fusionsproteine können außerdem lange und superlange spacer bzw. -linkerregionen wie z.B. polyglyzin oder Polyprolin enthalten, die mit Membranpenetrationsdomäne (MBD) oder Proteintransduktionsdomäne (PTD) fusioniert sind.

[0016] Die Fusionsproteine können aus Immunantwort-auslösenden Regionen wie z. B. Fc, B 7.1 oder B 7.2 enthalten, um die Wirkung der Komplexe zu erhöhen.

[0017] Die Fusionsproteine können Nukleinsäure- oder Polysaccharid-Bindedomänen enthalten bzw. mit denen fusioniert werden, um durch Vernichtung bzw. erhöhte Konzentration die Wirkung zu verstärken.

[0018] Die Fusionsproteine können mit GFP oder anderen fluoreszenten Proteinen fusioniert werden, um ihre Wirkung optisch zu verfolgen oder ihre Konzentration durch Intensität der Fluoreszenz zu messen.

[0019] Außerdem können diese Fusionsproteine Gelenkregionen, wie z.B. Fünf-Glyzinregionen und mindestens eine GST-, Histag oder eine andere Region zur Durchführung der Affinitätsreinigung enthalten.

[0020] Die beschriebene Proteintransduktionsdomäne (PTD) ist eine elf – Aminosäure lange Region,

die eine Region des HIV Tat Proteins darstellt.

[0021] Dem Forscher Dowdy und seinen Kollegen ist gelungen, 60 Proteine in der Größenordnung zwischen 15 kDa und 120 kDa zu fusionieren und nach folgender Denaturierung der Fusion mit Harnstoff ins Zytosol zu transportieren. (Science 285, 1569–1572, 1999 und Nature biotechnology Vol. 17 S. 942, Oct. 1999).

[0022] Nach der Internalisierung des Fusionsproteins wirkt die Mikrotubuli-Bindedomäne wie z.B. Gephyrin, Tau, MAP oder MID-1 im Zytosol. Sie bindet Mikrotubuli und fesselt somit das Zytoskelett. Das dynamische Gleichgewicht (Wilde et al. Nature cell biology 2001, March, vol. 3 und Carazo. Salas et al. Nature Cell biology 2001, March, vol. 3.) der Mikrotubuli wird beeinträchtigt und die jeweilige Zelle kann sich nicht mehr teilen. Sobald sie sich nicht mehr teilt, stirbt sie.

[0023] Dadurch wird das Wachstum des Tumors, z.B. eines soliden Tumors gehemmt.

[0024] In der **Fig. 1** der IgG-Antikörper-SPA-MBD-Fusionsprotein-Komplex schematisch dargestellt.

[0025] In der **Fig. 2** ist der IgG-Antikörper-Fusionsprotein-Komplex schematisch dargestellt. Das Fusionsprotein enthält PTD, langen spacer, SPA und MBD.

[0026] In der **Fig. 3** ist der IgG-Antikörper-Fusionsprotein-DNA-Komplex schematisch dargestellt.

[0027] Das Fusionsprotein enthält SPA, MBD und eine DNA-Bindedomäne, die DNA bindet.

[0028] In der **Fig. 4** ist der IgG-Antikörper-SPA-MBD-GFP-Fusionsprotein-Komplex schematisch dargestellt.

[0029] In der **Fig. 5** ist der IgG-Antikörper-Fusionsprotein-Komplex schematisch dargestellt.

[0030] Das Fusionsprotein enthält SPA, MBD und HLA-B7.1-Region die eine zusätzlich T-Zell-aktivierung induziert.

Ausführungsbeispiel

Beispiel 1

[0031] Klonierung und Expression des Fusionskonstrukttes SPA-5G-Gephyrin C DNA für Gephyrin wird durch PCR kloniert, bzw. die Homo sapiens Gephyrin (GPH) mRNA wird durch RT-PCR kloniert. Die Daten der GPH mRNA-Sequenz sind bei im Internet, beim National Center for Biotechnology Information, NIH,

Bethesda MD 208 94, USA erhältlich, sowie auf der Internet Seite von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/>... eotide...) zu finden.

[0032] C DNA für SPA ligiert mit dem Primer enthaltend die Information für die Fünf-Glyzin -Spacer wird ebenfalls mit PCR kloniert.

[0033] Das Fusionsprotein wird aus PCR-Produkten zusammengesetzt. Die PCR-Primern sind so konstruiert, dass sie Restriktionsstellen auf 5' und 3' Enden enthalten, um spätere Ligationsschritte durchzuführen. Die 5' und 3' Enden des Gephyrin-PCR-Produkts enthalten Bam HI und Hind III Restriktionsstellen. Die 5' und 3' Enden des SPA-PCR-Produkts enthalten Xmn I und Bg III Restriktionsstellen.

[0034] Nach der Amplifikation und Reinigung werden die PCR Produkten in PCR II Vektoren ligiert. Positive Klone werden durch Screening Plasmide richtiger Masse identifiziert. Die Klone werden durch DNA-Sequenzierung bzw. durch Standardmethoden überprüft bzw. bestätigt.

[0035] Das Gephyrin-PCR-Produkt wird aus der PCR II durch restriktive Spaltung durch Bam HI und Hind III herausgeschnitten, und SPA-PCR-Produkt wird aus dem PCR II durch Xmn I und Bg III herausgeschnitten.

[0036] Ligation der gephyrin und SPA-Gegmente in den pMal-c2 Expressionsvektor erfolgt unter Standard-Bedingungen. Der pMal-c2 Vektor wird mit Bam H I und Hind 3 behandelt. Der Gephyrin-Segment wird durch diese Behandlung in den pMal-c2 hinein ligiert.

[0037] PMal-c2-Gephyrin wird mit X mnl und Bam HI und geschnitten, um SPA Segment hinein zu ligieren.

[0038] Ligationspuffer wird aus 66 mM Tris PH 7,6, 5 mM Mg cl2, 5 mM DTT und 1 mM ATP, sowie aus der T4 DNA Ligase (insgesamt 20 Mikroliter) zusammengesetzt. Die Ligation wird bei 14°C durchgeführt.

[0039] Das Ligationsprodukt wird in E Coli transformiert, eaprimiert und abschliessend gereinigt.

Patentansprüche

1. Fusionsproteine, dadurch gekennzeichnet dass sie Antikörperbinde – und Mikrotubulibinderegionen enthalten.
2. Fusionsproteine nach dem Anspruch 1, gekennzeichnet, durch immunauslösende Regionen.
3. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1 und 2, gekennzeichnet durch lange und sehr lange

Spacer Regionen.

4. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1–3, gekennzeichnet durch Membranpenetrationsdomänen vorzugsweise am N-terminus der der langen oder superlangen Spacer Regionen.

5. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1–4, gekennzeichnet durch mindestens eine Nukleinsäure-binderegion.

6. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1–5, gekennzeichnet durch mindestens eine Polysaccharid-binderegion. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1–5, dadurch gekennzeichnet, dass die Antigen Binderegionen vorzugsweise aus folgenden Proteinen: EGF, FGF, CSF, MGF, IL-15, ausgewählt werden.

7. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1–6, gekennzeichnet durch GFP oder eine andere fluoreszente Region.

8. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1–7, gekennzeichnet durch mindestens eine GST-Histag oder eine andere Region zur Durchführung der Affinitätsreinigung.

9. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1–8, gekennzeichnet durch mindestens eine Gelenkregion vorzugsweise Fünf-Glycin-Region.

10. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1–9, dadurch gekennzeichnet, dass Antikörperbinderegionen vorzugsweise IgG binden und zwar Fc-Regionen der IgG binden und vorzugsweise aus folgenden regionen: Staphylokokkenprotein Aq (SPA), extrazelluläre Region des Fc Rezeptors CD 64 u.a. Regionen ausgewählt werden können.

11. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1–10, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikrotubulibinderegionen vorzugsweise aus folgenden Proteinen: Gephyrin, Tau, MAP, MID-1 ausgewählt werden.

12. Nukleinsäuresequenzen, DNA-Vektoren, Klontierungs- und Expressionssysteme für die Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1–11.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

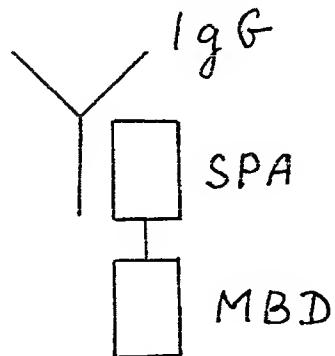


FIG. 2

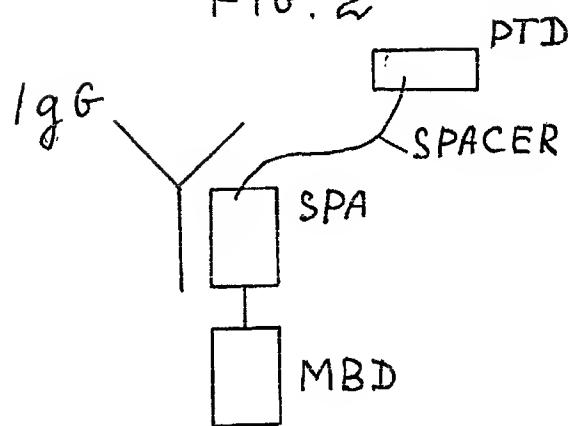


FIG. 3

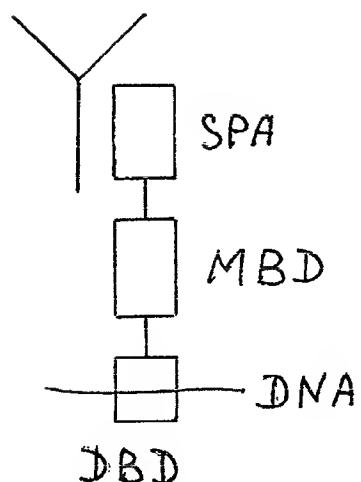


FIG. 4

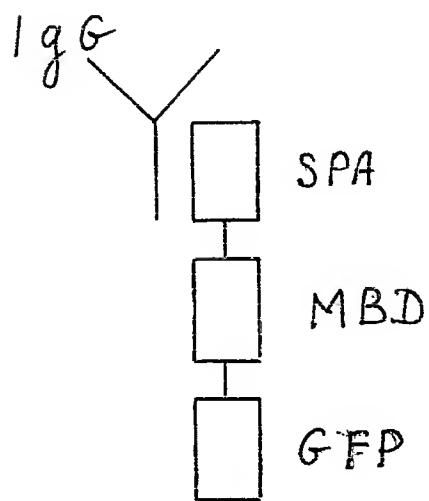


FIG. 5

